ESTRUCTURA Y FUNCION EN LA PIEL DE ANFIBIOS ANUROS

Por

Fabio Heredia Cano

Director del Departamento de Biología de la Universidad de Antioquia.
Medellín, Colombia.

INTRODUCCION

Los anfibios, principalmente los anuros —sapos y ranas—, han sido utilizados como material favorito para experimentación desde el comienzo del estudio biológico científico.

En 1628, el médico inglés William Harvey utilizaba ranas en sus estudios sobre el corazón. De esa fecha en adelante, un permanente flujo de investigación sobre los anuros ha contribuído a la explicación de numerosas estructuras y fenómenos fisiológicos, tanto en los anuros como en el hombre.

Una revisión de la literatura existente sobre el balance hídrico en los anfibios, demuestra el hecho de que se han realizado muy pocos intentos para explicar las bases morfológicas del fenómeno. Este ensayo tiene por objeto intentar la iniciación de una investigación que correlacione la estructura con la función en el proceso del movimiento del agua a través de la piel de dos especies de anuros que ocupan diferentes habitats en el mundo, en los cuales las condiciones ambientales son diferentes: los desiertos del suroeste de los Estados Unidos y las regiones tropicales áridas y salinas de poca elevación del noroeste de Suramérica, usando métodos fisiológicos e histológicos.

Materiales y métodos.

Dos especies desérticas de sapo han sido usadas como punto inicial en esta investigación: el "sapo-pala" *Scaphiopus couchi* del desierto de

Arizona (Fig. 1), y el llamado "sapo del desierto" (Stebbins, 1954) *Bufo punctatus* (Fig. 2) del Valle de Coachella, en California. *S. couchi* se ha colectado durante la noche en los tiempos de verano.

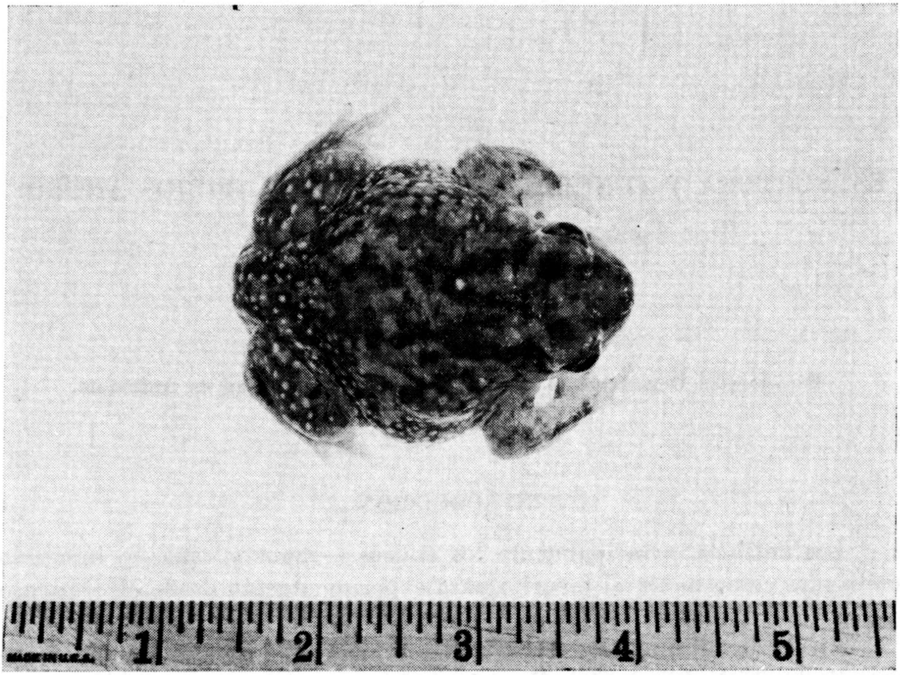

Fig. 1. — "Sapo-pala", *Scaphiopus couchi*, del desierto de Arizona.

B. punctatus ha sido colectado desde finales de abril hasta finales de septiembre, también durante la noche. Los ejemplares se han mantenido en el laboratorio, en jaulas separadas, con suelo de arena, puesto que el *S. couchi* es un cavador activo y eficiente; *B. punctatus* no lo es. En vez de cavar, *B. punctatus* usa huecos o madrigueras hechos por otros animales, rocas y otros abrigos naturales para protegerse contra el calor del verano y el frío del invierno. Un suelo ligeramente húmedo es suficiente como fuente de agua para el *S. couchi*, puesto que el exceso de humedad provoca, casi sin excepción, el desarrollo de grandes heridas de carácter probablemente micótico. Se necesita una fuente permanente de agua para el *B. punctatus*. Ambas especies se alimentan con el gusano de la harina, que es la larva del coleóptero *Tenebrio molitor*.

El aspecto fisiológico fue abocado con base en el comportamiento de las dos especies durante la hidratación, que parece estar relacionada con la morfología de tres áreas de la piel: la espalda, el abdomen y región

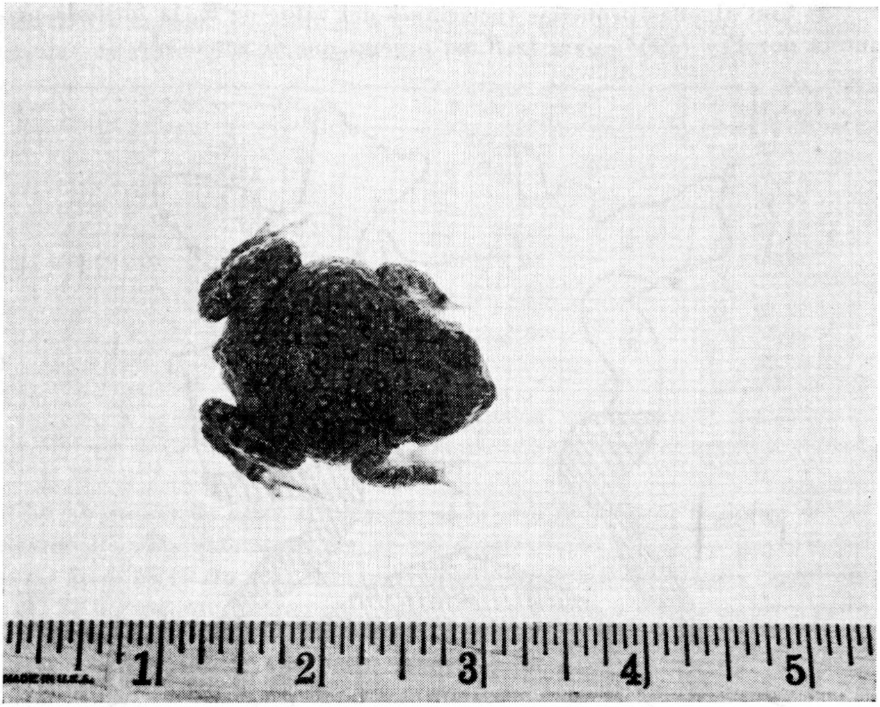

Fig. 2. — "Sapo del desierto", *Bufo punctatus,* del Valle de Coachella, California.

inguinal-femoral. (Fig. 3). Esta última será llamada *infemal* de ahora en adelante en este artículo. (Véase la discusión).

Para determinar la rata de absorción de agua por unidad de superficie, es necesario conocer el área corporal de los especímenes. Esto se puede hacer por tres métodos:

1º El método de papel de gráfica, en el cual el animal se mata, se le saca la piel cuidadosamente, se extiende ésta sobre papel de gráfica y se traza un perfil de la piel sobre el papel. Luego, el papel se corta siguiendo el perfil; se halla el área de la piel contando los cuadrados del papel. Se debe hacer una corrección para la piel que no es posible sacar de la parte de la cabeza, especialmente del cráneo.

2º Un método más rápido y probablemente más exacto consiste en determinar, por ejemplo, el peso promedio de 100 centímetros cuadrados de cierta clase de papel (no necesariamente papel de gráfica). Siguiendo el mismo proceso anterior, se corta el papel y se pesa cuidadosamente; la superficie de la piel es calculada proporcionalmente.

3º Con algunas pequeñas variaciones del valor de K, la fórmula propuesta por Fry (1903) para la *Rana pipiens*, puede ser usada:

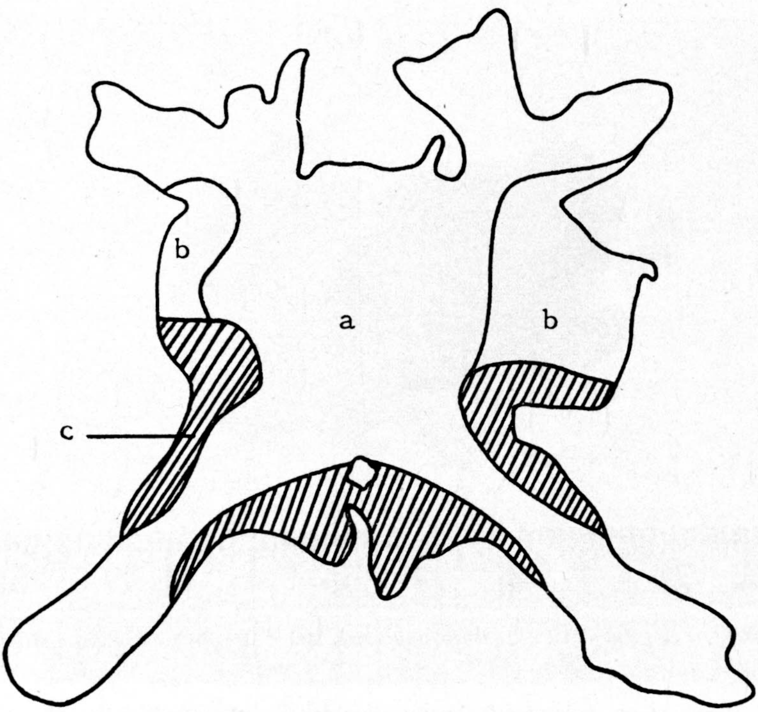

Fig. 3. — Areas de la piel de *B. punctatus:* (a) espalda; (b) abdomen; (c) infemal. Tamaño natural.

$S = K \times W^{0.67}$, donde

S = superficie del cuerpo en centímetros cuadrados.

K = 8 (una constante).

W = peso del cuerpo en gramos.

En experimentos tentativos, el autor ha encontrado resultados muy aproximados utilizando los métodos 2 y 3, haciendo K = 9 para especímenes de *B. punctatus, B. boreas, B. debilis* y *S. couchi.* (Tabla No. 1). Bentley (1958) utilizó K = 10 para ranas *Helioporus* y *Neobatrachus*. Usando los métodos 1 y 2, el autor encontró que la región infemal en todas estas especies es muy aproximadamente el 15% de la superficie corporal, en promedio.

Tabla No. 1. - **Superficie corporal de *B. punctatus* en cm.^{2}, calculada por: a) método del "papel de gráfica"; b) fórmula de Fry ($A = 9 \times W^{0.67}$).**

Ejemplar	Peso corporal (gr.)	Método a. (cm.^{2})	Método b. (cm.^{2})
1	8.02	37.61	36.27
2	8.13	38.65	36.63
3	8.86	39.20	38.79
4	9.40	43.60	40.41 (?)
5	9.93	40.44	41.85
6	12.65	47.15	48.60
7	12.87	50.80	49.97
8	13.10	48.50	50.13
9	16.15	59.50	57.96
X =	11.00	45.00	44.4

La absorción de agua a través de cada una de las tres regiones de la piel mencionadas anteriormente, se ha determinado haciendo impermeables las áreas en cierto momento por medio de petrolátum blanco (vaselina pura). Se ha encontrado que la vaselina es inofensiva a los animales y provee un 100% de impermeabilidad a la piel. (Véanse figs. 4 y 5).

La cantidad de agua absorbida se puede medir así:

1º Determinación de un peso standard inicial (p.e.i.) para cada espécimen después de un período de ayuno de ocho días, pero con agua ad libitum. La vejiga urinaria debe ser vaciada por canulación inmediatamente antes de la pesada. (Ruibal, 1962).

2º El animal se deshidrata al aire hasta un cierto porcentaje del p.e.i. (por ejemplo 70%).

3º El animal se ata a un marco de plástico por sus cuatro extremidades para evitar movimientos que podrían limpiar de vaselina alguna región que se desea que esté cubierta.

4º Las áreas escogidas de la piel se cubren con vaselina, cuidadosamente.

5º Todo el conjunto se sumerge en el agua, exceptuando las ventanas nasales del animal.

6º El aumento del peso del cuerpo se determina cada 15 o 30 minutos sustrayendo el peso de la vaselina y el marco, del peso total del sistema y, de esta manera, se halla la rata de absorción de agua por unidad de superficie por unidad de tiempo a través de las regiones no cubiertas por vaselina.

Para obtener resultados estadísticos significativos, se deben hacer por lo menos cinco réplicas de las mediciones simultáneamente.

La correspondencia entre la rata de absorción de agua y las características citológicas y morfológicas del área escogida de la piel, se establecen por:

1. Microscopia de luz.
2. Microscopia electrónica.

Muchas técnicas pueden ser usadas a este respecto. En la opinión del autor, la más conveniente es aquella que provee cortes para el microscopio de luz y el microscopio electrónico simultáneamente. En este caso, la técnica usada por Farquhar y Palade (1965) con la modificación del medio de inclusión para usar la mezcla "Bojax No. 1 A" -Araldite-Epon (Pangborn, U. C., Davis), podría ser una de las mejores en el presente.

RESULTADOS

Las características externas de la piel y el comportamiento típico durante la hidratación de las dos especies estudiadas en esta investigación, sugieren los resultados siguientes: en la figura 4 se dan las curvas posibles que comparan la rata de absorción a través de las tres áreas de la piel en el *B. punctatus.* O sea, que es probable que la rata de absorción a través de infemal sea mayor que la rata de absorción a través de las áreas abdominal y espalda. En la figura 5 se muestran las ratas probables para las mismas regiones en el *S. Couchi,* en donde se ve que las ratas ocurren en el mismo orden pero con diferencias menores entre ellas. Comparando las dos figuras, se puede sacar por lo menos dos conclusiones más:

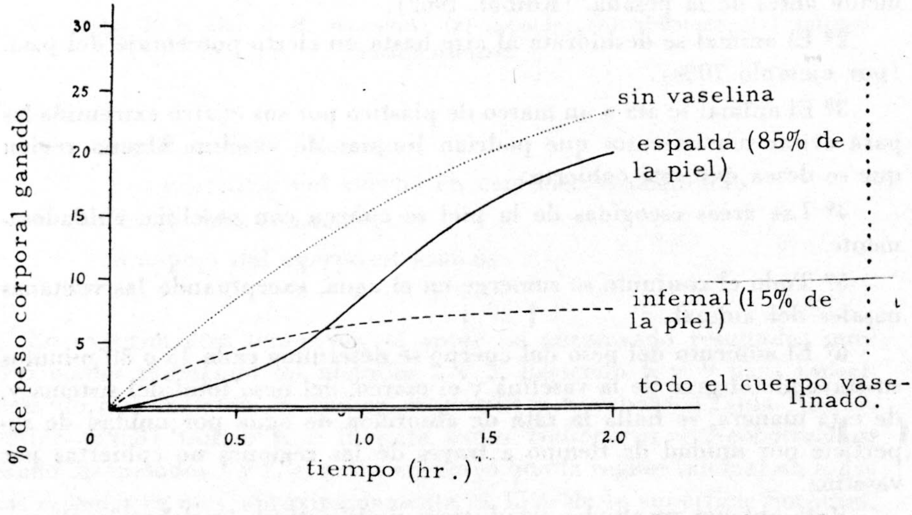

Fig. 4. — Rata de hidratación en *B. punctatus.* ( ); número de animales usados para promediar.

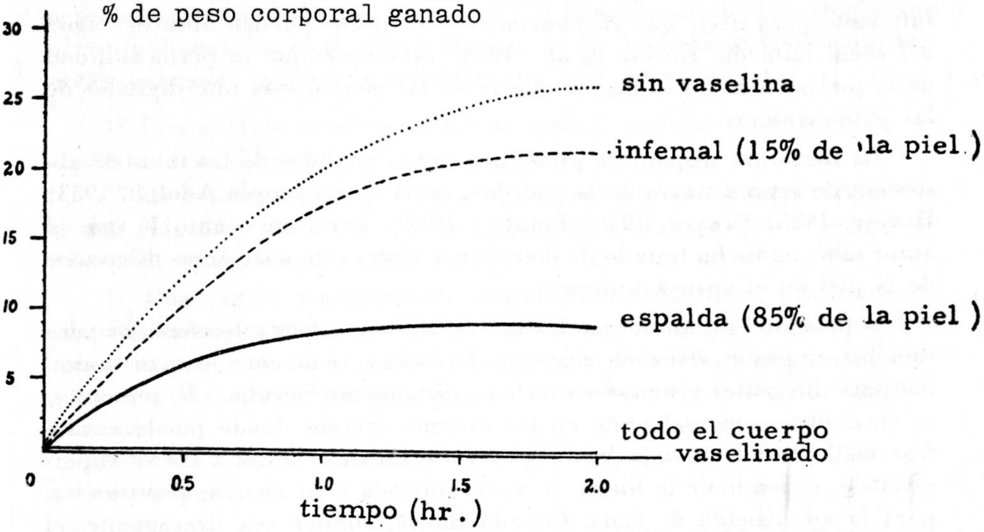

Fig. 5. — Rata de hidratación en *S. couchi*.

1ª La rata de absorción de agua a través de la región infemal en *B. punctatus* es mayor que en *S. couchi*.

2ª *S. couchi* absorbe más agua a través de la espalda que el *B. punctatus*.

Las posibles relaciones entre la estructura histológica y citológica de la piel y la rata de absorción de agua, son mucho más difíciles de predecir, pero es posible que haya diferencias en:

1. Abundancia y tamaño de los poros y formaciones canaliformes, si se hallan (como lo pronostican las electromicrografías tomadas por el autor).
2. Espesor del estrato córneo y de la epidermis en total.
3. Aspectos citoquímicos como actividad de ATPasa y gránulos de secreción.

DISCUSION

La habilidad de los anuros para tomar agua a través de la piel ha sido estudiada extensa e intensamente. Adolph (1933) dice que los anuros de agua dulce no beben. Ellos "beben" a través de la superficie corporal total. En 1932, Adolph demostró que *R. pipiens* es capaz de absorber agua de un papel húmedo. Sawyer (1956) encontró que especímenes de

Bufo pueden absorber agua de musgo húmedo, y el autor tiene evidencia suficiente para decir que *B. punctatus* y *S. couchi* pueden absorber agua del suelo húmedo. Hevesy *et al.* (1935) estableció que la permeabilidad de la piel abdominal es mayor que la de las membranas interdigitales de las patas traseras.

La literatura disponible presenta muchas medidas de las ratas de absorción de agua a través de la piel de anuros (por ejemplo Adolph, 1933; Hevesy, 1935; Sawyer, 1956; Bentley, 1958). Pero, en cuanto lo que el autor sabe, nadie ha tratado de determinar dicha rata para áreas diferentes de la piel en el mismo espécimen.

A pesar del hecho de que las dos especies de sapos seleccionados para esta investigación viven en regiones desérticas, realmente ocupan microhabitats diferentes y muestran un comportamiento peculiar. *B. punctatus* se encuentra principalmente en los cañones rocosos donde puede encontrar fácil protección bajo las rocas y en pequeñas cuevas. Para su supervivencia, depende de la lluvia, la arena húmeda y las charcas persistentes, para la adquisición de agua. Cuando llueve, aunque sea ligeramente, el sapo sale de su escondrijo, asienta su abdomen inferior o infemal sobre las rocas húmedas o el suelo. Cuando en la naturaleza o en el laboratorio el *B. punctatus* encuentra agua, coloca su región infemal en contacto con el agua pero mantiene el resto del cuerpo fuera de ella. Usando un cristalizador lleno con agua enterrado en la arena del terrario, de tal manera que el borde libre quede a nivel con la arena, el autor observó diariamente —y tomó fotografías— que el *B. punctatus* solamente pone en contacto su extremo posterior con el agua colgándose por medio de los dedos de las patas posteriores del borde del cristalizador. Si el sapo es obligado a sumergirse, permanece dentro del agua por unos pocos segundos y luego sale para volver a adoptar su típica posición de hidratación. En resumen, el *B. punctatus* usualmente no emplea la piel de su espalda para la hidratación; principalmente usa infemal para tal actividad. La piel de la espalda, por lo tanto, puede presentar una estructura que es capaz de proteger al animal contra la pérdida excesiva de agua a través de esa región.

Por el otro lado, *S. couchi* cava huecos relativamente profundos —hasta 30 centímetros (Maihew, 1965)— o probablemente más profundos (McClanahan, UCR, comunicación personal). En estas condiciones, toda la piel está en contacto con la arena húmeda circundante y la absorción del agua se puede realizar a través de toda la superficie corporal. Esto es demostrado por el hecho de que *S. couchi,* tan pronto como se le presenta un recipiente con agua, tanto en la naturaleza como en el laboratorio, se sumerge rápidamente y se está dentro del agua hasta que alcanza una total hidratación. Entonces, sale del agua, cava un hueco y se entierra.

Ahora, estos patrones de comportamiento parecen correlacionarse con aspectos externos de la piel observables al microscopio de disección y aun al ojo humano. En el *B. punctatus* uno puede identificar fácilmente tres áreas de la piel aparentemente diferentes en su morfología:

1º Una espalda considerablemente áspera, verrugosa, de color de herrumbre, con pintas negras.

2º Un abdomen blanquecino, comúnmente sin manchas, aparentemente más delgado y más suave que la espalda, el cual, bajo el microscopio de disección, aparece muy vesicular.

3º Una región transparente, delgada, amarillo-rojiza, profusamente vascularizada, punteada, con formaciones blancas muy vesiculares que aparecen como espumosas bajo el microscopio de disección, y que se extiende a través de las superficies internas de los muslos y de la región inguinal: infemal.

En el *S. couchi* las mismas tres regiones presentan las siguientes características:

1ª Una piel de la espalda verde, relativamente suave, aparentemente más delgada que la del *B. punctatus.*

2ª Una piel abdominal blanquecina, sin manchas y muy suave.

3ª Una región infemal delgada, transparente, bien vascularizada, provista también con formaciones vesiculares. Pero todas estas características son mucho menos prominentes que las del *B. punctatus.*

Todos estos hechos morfológicos y de comportamiento llevan a suponer que:

1º Debe existir ratas de absorción de agua notoriamente diferentes a través de las tres regiones de la piel previamente mencionadas en *B. punctatus.*

2º A través de la piel de la espalda, en ambas especies.

3º En un grado menor, a través de las otras dos áreas en las dos especies. (Véanse figs. 1 y 2).

Estudios histológicos sobre la piel de anuros han sido hechos desde por lo menos 1906 por Eycleshmeyer y en 1920 por Dawson. En los últimos cuatro años se ha realizado una considerable cantidad de trabajo en lo que se relaciona con la estructura histológica y citoquímica del tegumento de los anuros, tanto en el microscopio de luz como en el microscopio electrónico. Ninguno de los trabajos que el autor ha revisado ha sido dedicado al estudio comparativo de la estructura de la piel de anuros en diferentes partes del cuerpo del mismo espécimen. Voute (1963), Scheer (1964), Farquhar y Palade (1964) trabajaron sobre la piel del abdomen únicamente. Parakkal (1964), en el muslo de *R. pipiens* y Farquhar y Palade

(1965), en el abdomen y la espalda de ranas y el abdomen de *Bufo marinus.* Con la excepción de Farquhar y Palade, ninguno de los investigadores en este campo ha postulado la posible relación entre estructura y función en este órgano en lo que se refiere a la absorción de agua. Farquhar y Palade (1964, 1965 a) propusieron una impermeabilidad total de los espacios intercelulares en el *stratum corneum* de la piel de rana por medio de *zonulae occludents* que unen las células entre sí en una lámina continua e ininterrumpida. Uno de los resultados más importantes de estos estudios —dicen ellos— es la posibilidad de la existencia de una organización morfológica y fisiológica similar en todos los epitelios animales. Prometen una interpretación fisiológica más completa de la estructura de la piel de anuros en una publicación futura (1965 b).

Kirschener et al. (1960) postularon un transporte de agua específico, no-osmótico, independiente del transporte de sodio, a través de la piel de *R. pipiens,* cuando el animal es expuesto a una solución isotónica de un electrolito no-penetrante, por ejemplo, solución de Ringer con sus iones de sodio reemplazados por iones de magnesio o por colina no-transportable.

Todos estos hallazgos fisiológicos e histológicos, incluyendo las posibles ratas diferenciales de absorción de agua a través de diferentes regiones de la piel; la posibilidad de alguna absorción activa de agua, y los aspectos histológicos y citoquímicos establecidos, permitirían la postulación de una correlación entre la estructura y la función de la piel de los anuros. Más aún, se ha demostrado que los extractos pituitarios (Ewer, 1949; Sawyer, 1951, 1956) aumentan la permeabilidad de la piel de los anuros al agua y otras moléculas pequeñas.

Koefoed-Johnson y Using (1953) concluyeron, por mediciones de absorción de agua, que el efecto de los extractos pituitarios consiste en que aumenta el tamaño de los poros de la piel. Esta evidencia abre una posibilidad nueva para establecer una correlación estructura-función en la piel de los anuros a través de estudios fisiológicos y microscópicos.

RESUMEN

Esta investigación ha sido diseñada para demostrar si existe o no una correlación entre la estructura y la función de la piel de anfibios en el fenómeno de absorción de agua en dos especies de sapos que habitan en el desierto. Se presentan bases de comportamiento, fisiológicas y morfológicas, así como la literatura más relevante.

Los resultados que aquí se presentan son apenas el comienzo de una investigación de larga duración que implicaría más trabajo de campo y de laboratorio, así como una investigación más completa desde el punto de vista histológico y citoquímico, al microscopio de luz y al microscopio

electrónico. Esta clase de investigación llevaría a un estudio comparativo de por lo menos seis especies de anuros que vivan en dos o tres hábitat diferentes.

Uno de los objetivos de esta investigación es el de comparar los hallazgos que se obtengan en los anuros de los desiertos del Suroeste de los Estados Unidos e, inicialmente, los anuros de la Guajira colombiana.

BIBLIOGRAFIA

ADOLPH, E. F., 1932. — The vapour tension relations of frogs. Biol. Bull, *62:* 112-25.

— 1933. — Exchange of water in the frog. Biol. Rev., *8:* 224-40.

BENTLEY, LEE and MAIN, 1958. — Ecology of Australian frogs, in Biogeography and Ecology in Australia, p. 406.

DAWSON, A. B., 1920. — The integument of *Necturus maculosus,* Jour. Morph., XXXI, 487-577.

EWER, R. F., 1949. — The effect of pituitrin injection on the water balance of *Bufo regularis,* Reuss. Jour. Exp. Biol., *27:* 40.

EYCLESHYMER, A. C., 1906. — The development of Chromatophores in Necturus. Am. Journ. Anatomy., V: 309-313.

FARQUHAR, M. G. and G. E. PALADE, 1964. Functional organization of Amphibian skin. Proc. Nat. Ac. Sc. *51:* 569-577.

— 1965 a. — Cell junctions in amphibian skin. Jour. Cell Biol., *26:* 263-291.

— 1965 b. — Adenosine triphosphate activity in the epidermal cell membranes of frog and toad skin, in preparation.

FRY, 1913. — The blood volume of cold blooded animals as determined by experiments upon frogs and lizards., Quart. J. Exp. Phys., *7:* 185-192.

HEVESY, G. HOFER, E. and KROGH, A., 1935. — The permeability of the skin of frogs to water as determined by D_2O and H_2O. Skand. Arch. Physiol. *72:* 199-214.

KIRSCHNER, L. B., MAXWELL, R., and FLEMY, D., 1960. — Non-osmotic water movement across the isolated frog skin. J. Cell Comp. Phys., *55:* 267-273.

MAYHEW, WILBUR W., 1965. — Adaptation of the amphibian, *Scaphiopus couchi,* to desert conditions. Am. Mid. Nat., *74:* 95-109.

PARAKKAL, P. F., 1964. — A study of the fine structure of the epidermis of *Rana pipiens.* Jour. Cell Biol., *20:* 85-94.

RUIBAL, R., 1962. — Osmorregulation in amphibians from heterosaline habitats. Phys. Zool., XXXV: 218-223.

SAWYER, WILBUR H., 1956. — Increased permeability of frog bladder to water in response to dehydration and neurohypophyseal extracts. Am. Jour. Phys., 187: 312-314.

SCHEER, B. T. and M. W. MUMBACH, 1964. — The locus of the E. M. F. in the frog skin. J. Cell Comp. Phys., 64: 193.

STEBBINS, R. C., 1954. — Amphibian and reptiles of Western North America. McGraw-Hill Book Co., Inc. N. Y.

VOUTE, C. L., 1963. — An electron microscope study of skin of the frog. Rana pipiens. J. Ultr. Res., *9:* 497-510.